

## 精製副腎皮質チトクローム P-450 触媒反応に及ぼす 副腎ステロイド生成阻害剤の作用

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任：竹田亮祐教授)

永 井 国 雄

(昭和61年11月17日受付)

経口抗真菌剤である Ketoconazole 及び麻酔導入薬である Etomidate は、いずれもイミダゾール環を有し副腎皮質ステロイド合成阻害作用を示す事が論議されている。本研究は精製副腎皮質 P-450 再構成系を用い、Ketoconazole, Etomidate 及びステロイド合成阻害作用の知られた数種の薬剤につき、その作用を検討することを目的とした。P-450 再構成系は、チトクローム P-450 及びその電子伝達系から構成されウシ副腎皮質ミトコンドリア及びブタ精巣ミクロゾームから分離精製された。放射活性を有する基質を用い、種々の濃度に調整した各種薬剤を P-450 再構成系と共に反応させ、生成物の放射活性を計測することによりその阻害定数を求めた。Ketoconazole 及び Etomidate はコレステロール側鎖切断反応に対して拮抗的阻害作用を有し、その阻害定数はそれぞれ  $0.98 \mu\text{M}$ ,  $0.21 \mu\text{M}$  であった。Metyrapone の阻害定数、 $160 \mu\text{M}$  と比較して、両者とも P-450scc に対する強い阻害作用を持つことが示された。Mitotane (o, p' DDD), Trilostane 及び Aminoglutethimide は、いずれも精製 P-450scc に対して阻害作用は認めなかった。Ketoconazole は精製 P-450<sub>11 $\beta$</sub>  (11 位, 18 位及び 19 位水酸化酵素)再構成系による、デオキシコルチコステロン (DOC)水酸化反応に対して拮抗的阻害作用を有し、その阻害定数は DOC からコルチコステロン、DOC から 18 位水酸化 DOC への変換の場合ともに  $0.56 \mu\text{M}$  であった。Metyrapone の阻害定数  $0.10 \mu\text{M}$  に匹敵する作用を認めた。Etomidate 及び Aminoglutethimide の阻害定数はそれぞれ  $0.74 \mu\text{M}$ ,  $4.83 \mu\text{M}$  であった。17  $\alpha$  位水酸化プロゲステロンの 17-20 側鎖切断反応に対して Ketoconazole 及び Etomidate の阻害定数は  $2.60 \mu\text{M}$ ,  $16.0 \mu\text{M}$  であった。しかし同じ P-450scc II の担当する 17  $\alpha$  位水酸化反応に対しては両者ともに作用はみとめなかった。ミクロゾーム内に存在する今ひとつの P-450 である、P-450<sub>c<sub>21</sub></sub> (21 位水酸化酵素)に対しては、Ketoconazole のみが阻害定数  $1.26 \mu\text{M}$  を有した。電子伝達系に対してはいずれの薬剤も広い濃度範囲に渡って直接的影響は観察されなかった。本研究により副腎皮質ステロイド合成阻害作用の知られたいくつかの薬剤に関し、その阻害様式、阻害部位、相対的阻害強度があきらかになった。

**Key words** ステロイド合成, チトクローム P-450, ケトコナゾール, エトミデート

従来、副腎皮質ステロイド合成阻害剤としては、Metyrapone (2-methyl-1, 2-di-3-pyridyl-1-propanone) を始め o, p'-DDD (1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2, 2-dichloroethane), Aminoglutethimide (p-( $\alpha$ -aminophenyl)- $\alpha$ -ethylglutaramide) 及び Trilostane (4, 5-epoxy-17-hydroxy-3-oxoandrostane-2-carbonitrile) が知られ、治療的にも応用され

ている。これらに加えて最近、Ketoconazole (cis-1-acetyl-4-[4-((2-(2, 4-dichlorophenyl)-2-(1H-imidazole-1-ylmethyl)-1, 3-dioxolan-4-ol)methoxy)phenyl]piperazine), Etomidate (R-(+)-ethyl-[1-(phenylethyl)-1H-imidazole-5-carboxylate] 等が新しく問題にされるようになった。

Ketoconazole (Nizoral, Janssen Pharmaceutica,

Abbreviations: DLPC, dilauroilphosphatidylcholine; DOC, deoxycorticosterone; FpD, NADH-cytochrome b<sub>5</sub> reductase; FpT, NADPH-cytochrome P-450 reductase; Ki, inhibition constant; P-450, cytochrome P-450; TN, Turnover number.

Beerse, Belgium)は、広スペクトルを持つ経口抗真菌剤として開発されたイミダゾール環を有する薬剤である。本剤の抗真菌作用は、真菌内でラノステロールの14位脱メチル化を阻害してエルゴステロールの産生を減少させ、真菌の成長を抑制することに依ると考えられている<sup>1)</sup>。当初、本剤はステロイドホルモンの生合成あるいは受容体との結合に対して影響を与えないとされたが、この点に関する十分な検討はなされていなかった。しかし近年健康者に Ketoconazole を投与すると迅速 ACTH 刺激試験に対する血漿コルチゾール反応が低下すること<sup>2)</sup>、あるいはコルチゾール産生副腎皮質腫瘍患者に於て本剤が血漿コルチゾール低下作用を持つこと<sup>3)</sup>、更には数種の腫瘍に対する臨床応用例<sup>4,5)</sup>も相次いで報告されている。

Etomidate (Janssen pharmaceutica, Beerse, Belgium)は同じくイミダゾール環を有し、麻酔導入薬ないし鎮静薬として用いられている。本剤の副作用に関しては1981年から1982年にかけて、Ledinghamら<sup>6)</sup>が各種の複雑損傷を受けたICU患者の死亡率が急増した事実とともに、これらの患者では血漿コルチゾール値が低い事、死亡率の上昇が Etomidate の登場と期を一にしている事に注目したのが契機となった。その後相次いで副腎ステロイド合成阻害作用のある事が *in vivo*<sup>7,8)</sup>あるいは *in vitro*<sup>9)~12)</sup>の系で報告されている。

Ketoconazole はミトコンドリア P-450 酵素に共通の阻害作用を示す事が Loose ら<sup>12)</sup>によって報告され、Etomidate もまた同様の可能性が指摘されている<sup>10,11)</sup>。著者はすでに精製されたウシ副腎皮質ミトコンドリア P-450<sub>scc</sub> (コレステロール側鎖切断酵素)、P-450<sub>11 $\beta$</sub>  (11 $\beta$ 位、18位及び19位水酸化酵素)を用い、Ketoconazole のステロイド生合成に対する作用を検討し、阻害定数及び他のステロイド合成阻害剤と比較しその成績を報告<sup>13,14)</sup>した。

本研究ではこれまでに得られた知見に加えて、Etomidate のミトコンドリア内 P-450 に対する作用、ミクロゾーム内に存在する P-450<sub>c<sub>21</sub></sub> (21位水酸化酵素)、P-450<sub>scc</sub> II (17 $\alpha$ 位水酸化酵素及び C21 ステロイド 17-20 側鎖切断酵素)に対する Ketoconazole、Etomidate の阻害効果及びステロイド合成阻害作用の知られた数種の薬剤との比較検討を行った。

#### 材料および方法

##### I. 実験材料

P-450<sub>scc</sub>、P-450<sub>11 $\beta$</sub> 、P-450<sub>c<sub>21</sub></sub>、P-450<sub>scc</sub> II 及びアドレノドキシ、アドレノドキシ還元酵素、NADH-チトクローム b<sub>5</sub>還元酵素 (FpD)、NADPH-チトクロ-

ム P-450還元酵素 (FpT)、チトクローム b<sub>5</sub>などの電子供与系諸要素は、須原ら<sup>15,16)</sup>の方法に準じて精製した。

Ketoconazole, o, p'DDD はそれぞれ Janssen 社及び Rousse 社より提供された、Metyrapone, Amino-glutethimide については Ciba Geigy 社より提供された。Trilostane はウィントロップ研究所、ニュキャスル市 J. Harper 先生より、また Etomidate はミュンヘン大学、小児外科、H. G. Dorr 教授より恵与された。

##### II. コレステロールからプレグネノロンへの反応阻害実験 (P-450<sub>scc</sub> 触媒コレステロール側鎖切断反応)

[1 $\alpha$ , 2 $\alpha$  (n)-<sup>3</sup>H]コレステロール (Amersham 社)を、放射活性  $1.0 \times 10^4$  cpm、終濃度 40  $\mu$ M, 80  $\mu$ M 及び 200  $\mu$ M に調整し、Tween20 (半井化学薬品社)を加え、5分間インキュベーションした。室温にて放冷後、更に 15 nM アドレノドキシ、250 nM アドレノドキシ還元酵素、6 nM グルコース-6-リン酸 (Boehringer Mannheim 社)、1.6 単位グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (Boehringer Mannheim 社)、0.2  $\mu$ M P-450<sub>scc</sub> 及び 0.3 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) からなる混合液を加えた。ここに種々の濃度に調整した各種阻害剤を加え、37°C で2分間プレインキュベーションを行った。0.4 mM NADPH (Boehringer Mannheim 社)を加えることによって水酸化反応を開始し5分後に、1.6 ml の停止液 (メタノール:クロロホルム = 1:1)を加え反応を終結した。内部標準として [4-<sup>14</sup>C]プレグネノロン (Amersham 社)を加え、0.5 ml の蒸留水にて水洗10秒間攪拌の後、1分間3000回転で遠心分離した。有機溶媒層を分離した後、蒸発乾固し少量のクロロホルムで再溶解し、シリカゲル薄層クロマトグラフィプレート (G25UV, Macherey-Nagel 社)にスポットした。ベンゼン:酢酸エチル = 6:4 混合液で展開後、検出した生成物をプレートからきり取り放射活性を計測した (Aloka, LSC-671 液体シンチレーションスペクトロメーター)。

##### III. DOC からコルチコステロンへの反応阻害実験 (P-450<sub>11 $\beta$</sub> 触媒 11位、18位水酸化反応)

[1 $\alpha$ , 2 $\beta$  (n)-<sup>3</sup>H]DOC (Amersham 社)を終濃度 15  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 200  $\mu$ M に調整し、種々の濃度の各種阻害剤を加えた。II に準じて電子伝達系諸要素を加え、37°C で2分間プレインキュベーションの後、0.5  $\mu$ M P-450<sub>11 $\beta$</sub> によって水酸化反応を開始した。37°C で2分間インキュベーションし、反応終結後内部標準として [4-<sup>14</sup>C]コルチコステロン (Amersham 社)を加え、有機溶媒層を分離した。シリカゲル薄層クロマトグラ-

フィにスポットし、ベンゼン：アセトン＝65：35 混合液にて展開した。生成物をプレートからかきとり放射活性を計測した。

#### IV. 17 $\alpha$ 位水酸化プロゲステロンからアンドロステンジオンへの反応阻害実験 (P-450<sub>scc</sub> II 触媒 17-20 側鎖切断反応)

[7 (n) -<sup>3</sup>H]17 $\alpha$  位水酸化プロゲステロン (Amersham 社) を終濃度 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M 及び 200  $\mu$ M に調整し、電子伝達系として 0.4 mM NADP<sup>+</sup>, 1.4 mM グルコース-6-リン酸, 1.0 単位グルコース-6-リン酸脱水素酵素を加え、更に  $2.4 \times 10^{-2}$   $\mu$ M チトクローム b<sub>5</sub>, 0.4 mU FpT, 4 mU FpD を加えた。ここに  $2.2 \times 10^{-2}$   $\mu$ M P-450<sub>scc</sub> II 及び阻害剤とともに、リン脂質である Dilauroilphosphatidylcholine (DLPC) (Sigma 社) を加え、37°C で 2 分間プレインキュベーションした。NADPH にて反応を開始し、30 分後に反応を停止し II に準じて生成物の放射活性を計測した。11 $\beta$  水酸化プロゲステロンから 11 $\beta$ , 17 $\alpha$  位二水酸化プロゲステロンへの阻害反応 (P-450<sub>scc</sub> II 触媒 17 $\alpha$  水酸化反応) も本法に準じた。基質としてプロゲステロンでなく 11 $\beta$  位水酸化プロゲステロンを用いたのは、17 $\alpha$  位水酸化反応は受けるが次の 17-20 側鎖切断反応は 11 $\beta$  水酸基が障害になるために進行しないためである。

#### V. 17 $\alpha$ 位水酸化プロゲステロンから 11-デオキシコルチゾールへの反応阻害実験 (P-450<sub>c<sub>21</sub></sub> 触

#### 媒 21 位水酸化反応)

基質としては P-450<sub>c<sub>21</sub></sub> との親和性との違いからプロゲステロンではなく、17 $\alpha$  位水酸化プロゲステロンを採用した。以下 IV に準じた。

#### VI. 副腎皮質ミトコンドリア及びミクロゾーム内電子伝達系に対する各種阻害剤の作用

ミトコンドリア及びミクロゾーム内電子伝達系 (II 及び IV に準ずる) に、20  $\mu$ M のチトクローム C (Sigma 社) を加えた。室温にて 0.4 mM NADPH を加えて反応を開始した。550 nm におけるチトクローム C の吸光度の変化率を計測した。

### 成 績

#### I. コレステロールからプレゲネロンへの反応に及ぼす各種薬剤の効果

##### 1. Ketoconazole

本反応は Ketoconazole によって濃度依存性をもって阻害された。50% 阻害濃度は約 1.9  $\mu$ g/ml であった (図 1a)。図 1b よりこの阻害は拮抗阻害の様式を取り、その阻害定数は 0.98  $\mu$ M であった。基質濃度 200  $\mu$ M に対する反応回転数 (Turnover Number, T. N.) は約 7.4 mol-product/min/mol-P450 であった。

##### 2. Etomidate

Etomidate も本反応を濃度依存性をもって阻害し、50% 阻害濃度は約 0.15  $\mu$ g/ml であった (図 2a)。図 2b よりこの阻害は拮抗阻害の様式を取り、その阻害定

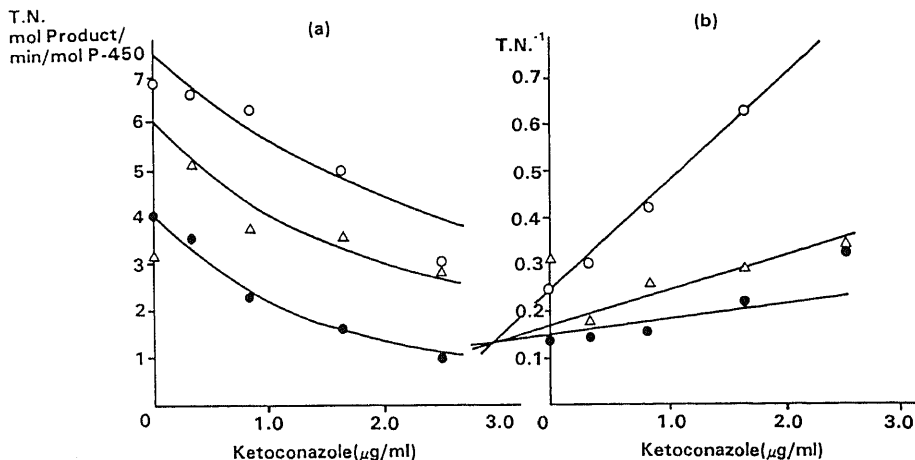


Fig. 1. Inhibitory effect of Ketoconazole on P-450<sub>scc</sub> catalyzed cholesterol to pregnenolone reaction.

Cholesterol concentration: ○, 200  $\mu$ M; △, 80  $\mu$ M; ●, 40  $\mu$ M.

数は  $0.21 \mu\text{M}$  と求められた。

### 3. Aminoglutethimide, o, p'DDD 及び Trilostane

図3, 図4, 図5に示すごとく  $0 \sim 2.5 \mu\text{g/ml}$  の濃度範囲内では, 本反応に対する作用は認められなかった。

## II. DOC からコルチコステロンへの反応に及ぼす各種薬剤の効果

### 1. Ketoconazole

本反応は Ketoconazole によって濃度依存性を持って阻害された。50%阻害濃度は約  $0.7 \mu\text{g/ml}$  であった(図6a)。図6bから阻害定数を求めると  $0.56 \mu\text{M}$  であった。

### 2. Etomidate

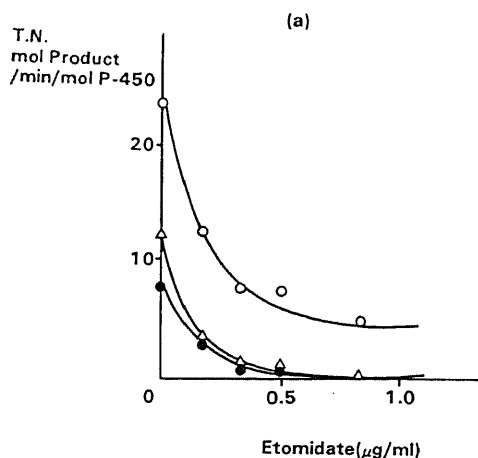


図7aより50%阻害濃度は約  $0.15 \mu\text{g/ml}$  であり, 図7bよりその阻害定数は  $0.74 \mu\text{M}$  と求められた。

### 3. Aminoglutethimide

本反応は Aminoglutethimide によっても阻害を受けた。図8aより50%阻害濃度は約  $2.0 \mu\text{g/ml}$  であり, 図8bからその阻害定数は  $4.83 \mu\text{M}$  であった。

### 4. Trilostane 及び o, p'DDD

$0 \sim 2.0 \mu\text{g/ml}$  の濃度範囲内では本反応に対する作用は認められなかった。

## III. DOC から 18 位水酸化 DOC 及び, コルチコステロンから 18 位水酸化コルチコステロンへの反応に及ぼす Ketoconazole の効果

### 1. DOC から 18 位水酸化 DOC への反応

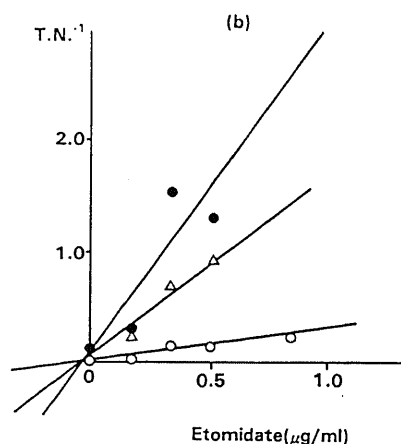


Fig. 2. Inhibitory effect of Etomidate on P-450scc catalyzed cholesterol to pregnenolone reaction.

Cholesterol concentration:  $\circ$ ,  $200 \mu\text{M}$ ;  $\triangle$ ,  $80 \mu\text{M}$ ;  $\bullet$ ,  $40 \mu\text{M}$ .

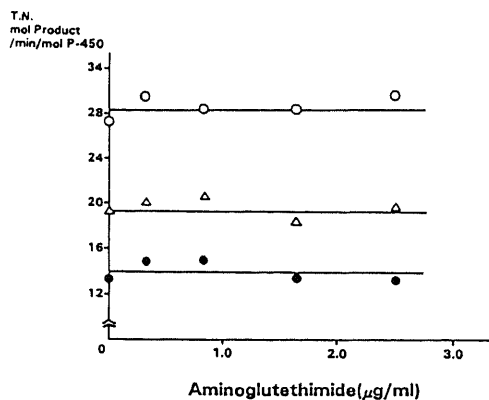


Fig. 3. Inhibitory effect of Aminoglutethimide on P-450scc catalyzed cholesterol to pregnenolone reaction.

Cholesterol concentration:  $\circ$ ,  $200 \mu\text{M}$ ;  $\triangle$ ,  $80 \mu\text{M}$ ;  $\bullet$ ,  $40 \mu\text{M}$ .

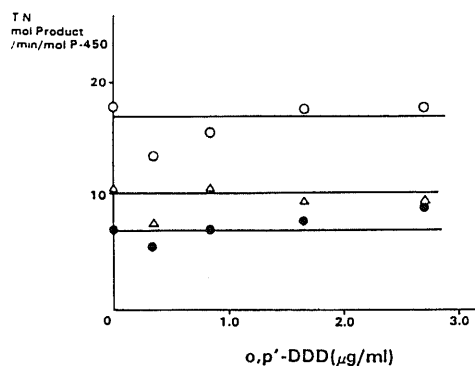


Fig. 4. Inhibitory effect of Mitotane (o, p'-DDD) on P-450scc catalyzed cholesterol to pregnenolone reaction.

Cholesterol concentration:  $\circ$ ,  $200 \mu\text{M}$ ;  $\triangle$ ,  $80 \mu\text{M}$ ;  $\bullet$ ,  $40 \mu\text{M}$ .

本反応は Ketoconazole に依って濃度依存性を持って阻害された。

50%阻害濃度は約  $0.33 \mu\text{g/ml}$  であった (図 9a), 図 9b よりその阻害定数は  $0.56 \mu\text{M}$  であり図 6 で求めた値と一致した。また基質濃度  $200 \mu\text{M}$  に対する反応回転数は約  $10 \text{ mol-product/min/mol-P450}$  であった。

2. コルチコステロンから 18 位水酸化コルチコステロンへの反応

Ketoconazole は強い阻害作用を示し, 50%阻害濃度は  $0.03 \mu\text{g/ml}$  以下であった (図 10)。また基質濃度  $250 \mu\text{M}$  に対する反応回転数は約  $2.6 \text{ mol-product/}$

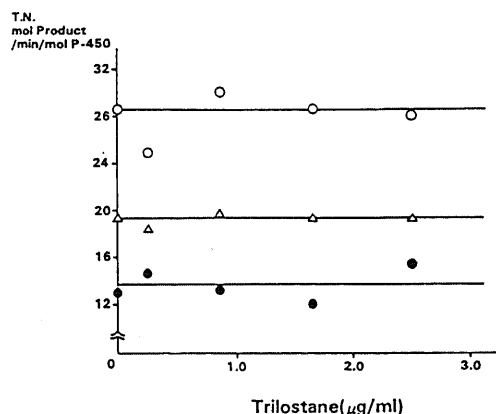


Fig. 5. Inhibitory effect of Trilostane on P-450scc catalyzed cholesterol to pregnenolone reaction. Cholesterol concentration:  $\circ$ ,  $200 \mu\text{M}$ ;  $\triangle$ ,  $80 \mu\text{M}$ ;  $\bullet$ ,  $40 \mu\text{M}$ .

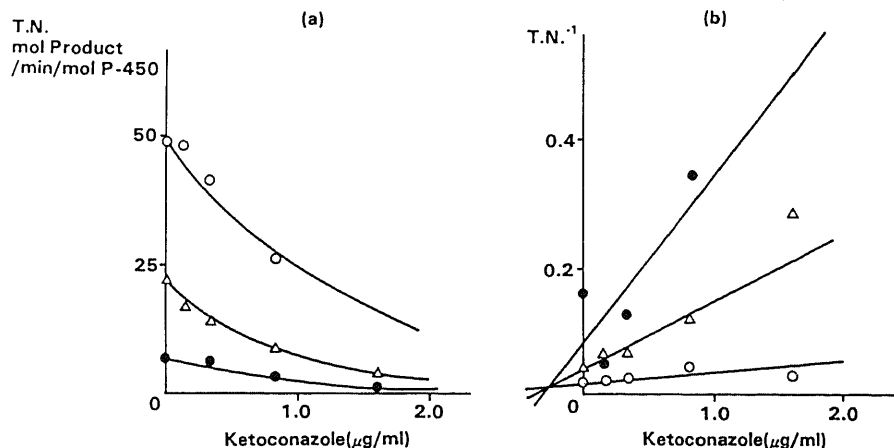


Fig. 6. Inhibitory effect of Ketoconazole on P-450<sub>11 $\beta$</sub>  catalyzed deoxycorticosterone (DOC) to corticosterone reaction. DOC concentration:  $\circ$ ,  $200 \mu\text{M}$ ;  $\triangle$ ,  $30 \mu\text{M}$ ;  $\bullet$ ,  $15 \mu\text{M}$ .

min/mol-P450 であった。

#### IV. $17 \alpha$ 位水酸化プロゲステロンからアンドロステンジオンへの反応に及ぼす各種阻害剤の効果

##### 1. Ketoconazole

図 11 より阻害定数は  $2.60 \mu\text{M}$  と求められた。

##### 2. Etomidate

図 12 より阻害定数は  $16.0 \mu\text{M}$  と求められた。

##### 3. その他の薬剤

いずれの薬剤も P-450scc II が触媒する 17-20 側鎖切断反応には作用は認められなかった。

#### V. $11 \beta$ 位水酸化プロゲステロンから $11 \beta$ , $17 \alpha$ 位水酸化プロゲステロンへの反応

Ketoconazole (図 13) 及び Etomidate (図 14) を含めたいずれの薬剤も, P-450scc II が触媒する  $17 \alpha$  位水酸化反応には影響を与えなかった。

#### VI. $17 \alpha$ 位水酸化プロゲステロンから 11-デオキシコルチゾールへの反応

図 15 より Ketoconazole は阻害作用を示しその阻害定数は  $1.26 \mu\text{M}$  であった。Etomidate (図 16) を含めいずれの薬剤も本反応に対する作用は認められなかった。

#### VII. 電子伝達系に及ぼす各種薬剤の作用

チトクローム C の  $550 \text{ nm}$  における吸光度の変化率はミトコンドリア内電子伝達系 (表 1) 及びミクロゾーム内電子伝達系 (表 2) のいずれに対しても, 各阻害剤とも差異を認めずかつ濃度による影響も観察されなかった。

## 考 察

Ketoconazole は広スペクトルを持つ経口真菌剤と

して開発されたイミダゾール誘導体である。その抗真菌作用は真菌内でラノステロールから14位脱メチル化を阻害してエルゴステロール産生を減少させ真菌の成長を抑制させると考えられ、哺乳動物の細胞においても同様の機序でコレステロール合成を低下させる事が知られている。本剤のステロイド生合成に与える影響については当初重視されていなかった。しかし女性化乳房、インポテンツ等を説明する事実として血中テストステロンの低下、エストラジオール/テストステロ

ン、黄体ホルモンの上昇が報告<sup>17)</sup>され、Ketconazole 400 mg 服用により、血中および唾液中のテストステロン濃度が低下すること<sup>18)19)</sup>等性ホルモンへの影響が相次いで報告された。Santen ら<sup>20)</sup>は、健康者を対常に Ketoconazole および偽薬剤服用前後でアンドロステンジオン、テストステロンは低下するが17 $\alpha$ 位水酸化プロゲステロンの上昇をみたことにより、Ketoconazole の作用が17-20側鎖切断酵素阻害にあることを示唆している。Coster ら<sup>21)</sup>、もビーグル犬

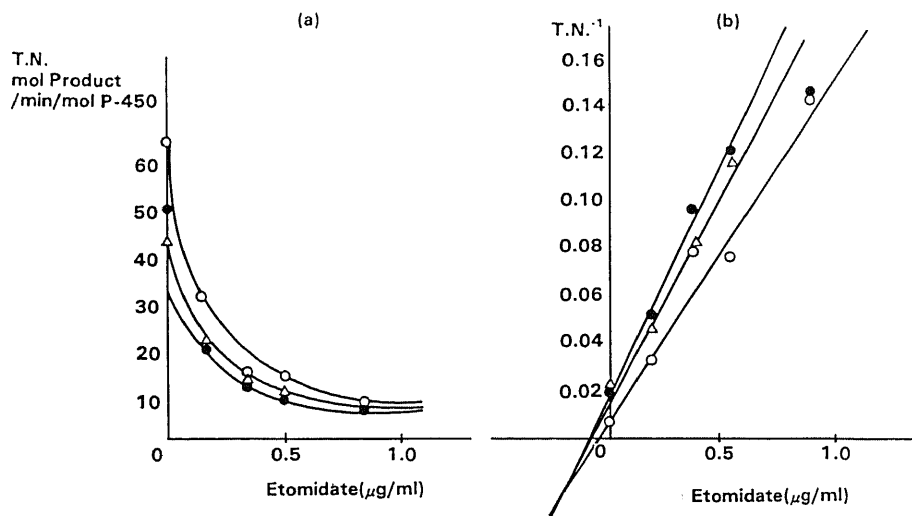


Fig. 7. Inhibitory effect of Etomidate on P-450<sub>11β</sub> deoxycorticosterone (DOC) to corticosterone reaction.

DOC concentration: ○, 200 μM; △, 80 μM; ●, 40 μM.

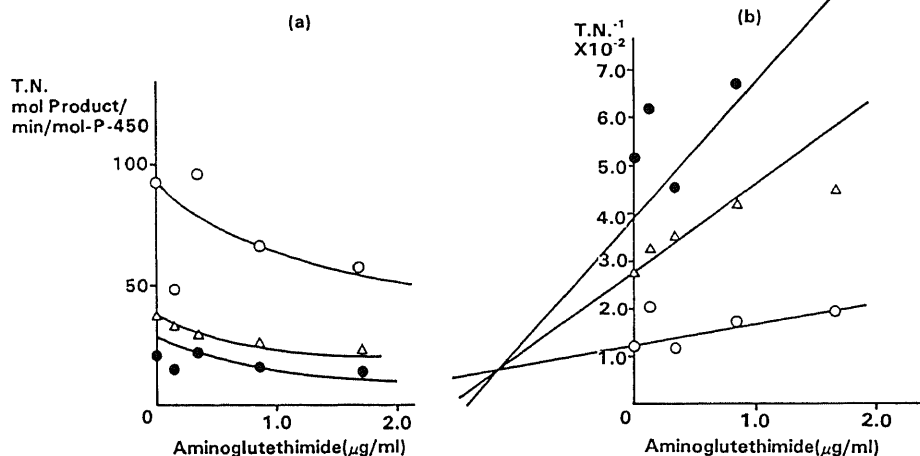


Fig. 8. Inhibitory effect of Aminoglutethimide on P-450<sub>11β</sub> catalyzed deoxycorticosterone (DOC) to corticosterone reaction.

DOC concentration: ○, 200 μM; △, 80 μM; ●, 40 μM.

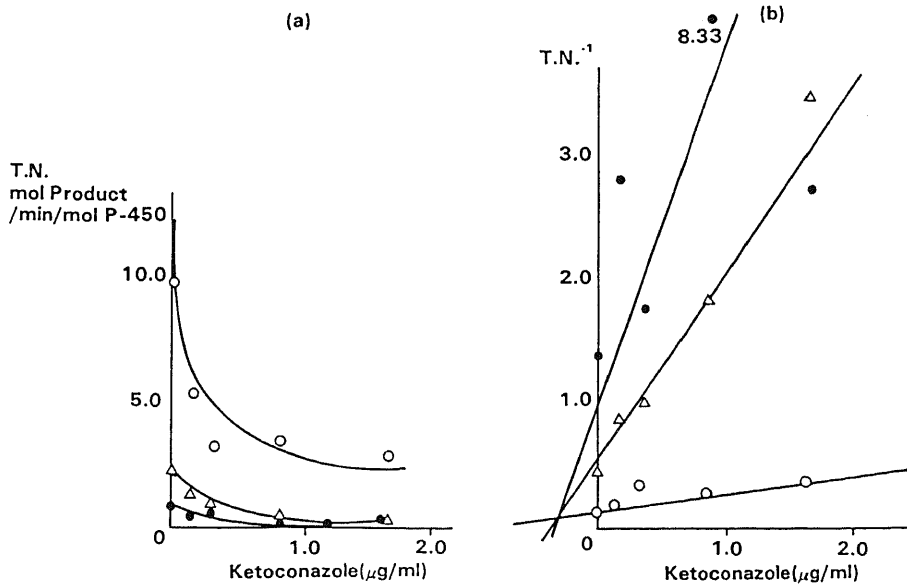


Fig. 9. Inhibitory effect of Ketoconazole on P-450<sub>11β</sub> catalyzed deoxycorticosterone (DOC) to 18-hydroxyDOC reaction.  
DOC concentration: ○, 200 μM; △, 80 μM; ●, 40 μM.

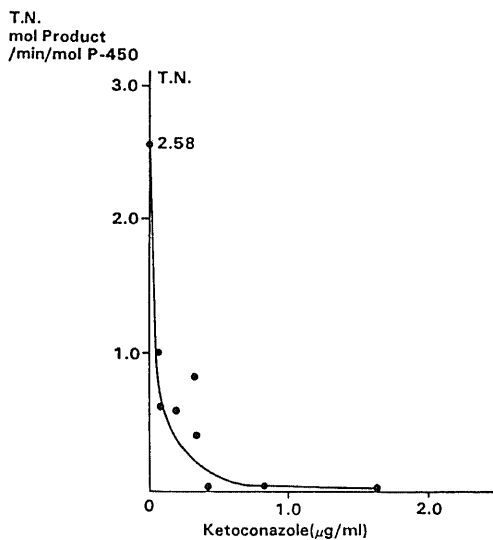


Fig. 10. Inhibitory effect of Ketoconazole on P-450<sub>11β</sub> catalyzed corticosterone to 18-hydroxycorticosterone reaction.  
corticosterone concentration: ●, 250 μM.

を用いた実験で同様の報告をしている。

コルチコステロイド生成に対する阻害効果についても多数の報告がある。副腎遊離細胞を用いた in vitro 実験系に放射性基質ステロイドを添加して行っ

た検討<sup>12)</sup>によって、Ketoconazole は DOC からコルチコステロン、コレステロールからプレグネロンへの転換反応を阻害することが確認された。また腎におけるビタミン D 代謝にあずかる P-450 依存酵素、24 位水酸化酵素を用量依存性に阻害することから、Ketoconazole は P-450 系酵素に共通の阻害剤であることも示唆された。Engelhardt<sup>23)</sup>は、正常対照および 5 例のクッシング症候群患者を対象に各種血中ステロイドの測定および ACTH 刺激に対する反応性を検討するとともに、副腎組織片、ホモジネートと放射性ステロイドとのインキュベーション実験によってその阻害部位が 11β 水酸化酵素であることを示唆した。おなじイミダゾール環を有する麻酔導入薬である Etomidate に関しても、コレステロール側鎖切断反応あるいは 11β 水酸化反応に対する阻害作用が相次いで報告<sup>26)~29)</sup>されている。

これらのいずれの報告も in vitro あるいは組織片、遊離細胞を用いた実験系であるため、ステロイド代謝における各単位反応にたいする検討は不十分であり、詳細な阻害部位および他の阻害剤との比較は不明であった。

今回、著者が得た成績では、精製された副腎皮質ミトコンドリア P-450<sub>scc</sub>、P-450<sub>11β</sub>、ミクロゾーム P-450<sub>c21</sub>、P-450<sub>scc</sub> II およびそれぞれの電子伝達系酵素からなる、水酸化反応再構成系を用いることで各薬剤

の阻害様式、阻害部位およびそれぞれの相対阻害強度が明らかになった。

P-450<sub>scc</sub>が触媒するコレステロールからプレグネノロンの変換に関しては、KetoconazoleおよびEtomidateが阻害作用を示した。その阻害定数はそれぞれ  $0.98 \mu\text{M}$ ,  $0.21 \mu\text{M}$  であり、すでに知られている Metyrapone の阻害定数  $160 \mu\text{M}$  と比較すると両者とも強力な拮抗的阻害作用を有することが判明した。本反応に対する両阻害剤の作用は既に示唆されていたが、さらに定量的に評価することができた。o, p'-DDD, Aminoglutethimide に関しては、コレステロール側鎖切断反応に対する阻害作用が報告<sup>30)~33)</sup>されている。しかし今回の成績からは直接的影響は観察されてい

い。

Ketoconazole, Etomidate とともに、P-450<sub>11 $\beta$</sub> が触媒する、DOC からコルチコステロンへの反応を濃度依存性をもって阻害し、反応回転数 (T.N.) の逆数と阻害剤濃度とは比例関係がみられ、拮抗的阻害の式を満足した。阻害定数はそれぞれ  $0.56 \mu\text{M}$ ,  $0.74 \mu\text{M}$  であった。Metyrapone の阻害定数は約  $0.1 \mu\text{M}$ <sup>34)</sup>であり両者ともに Metyrapone と同様の強い阻害作用を持つことが示された。

P-450<sub>11 $\beta$</sub> はステロイド 11 $\beta$  位、18 位および 19 位に共通の水酸化酵素である。今回の Ketoconazole の成績で DOC 濃度  $200 \mu\text{M}$  を用いた時の反応回転数は、11 $\beta$  位、18 位それぞれにつき  $48 \text{ mol-product/min/}$

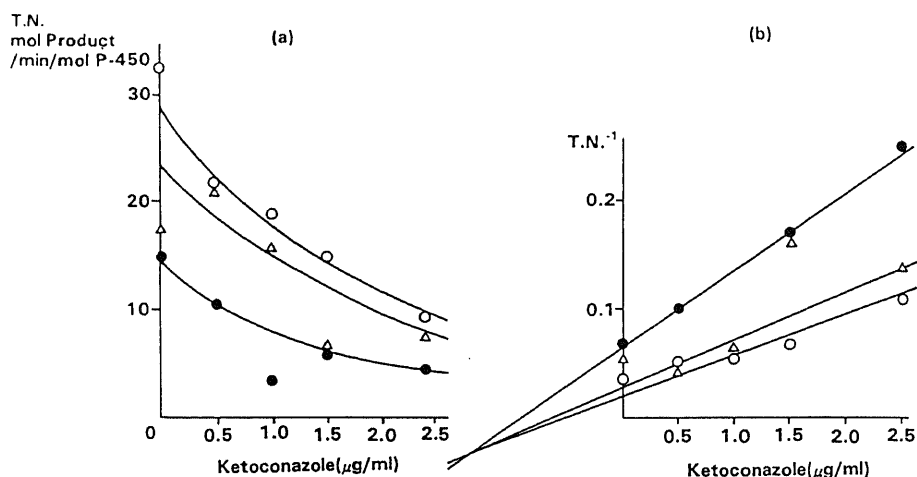


Fig. 11. Inhibitory effect of ketoconazole on P-450<sub>scc</sub> II catalyzed 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone to androstenedione reaction.

17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone concentration:  $\circ$ ,  $200 \mu\text{M}$ ;  $\triangle$ ,  $40 \mu\text{M}$ ;  $\bullet$ ,  $20 \mu\text{M}$ .

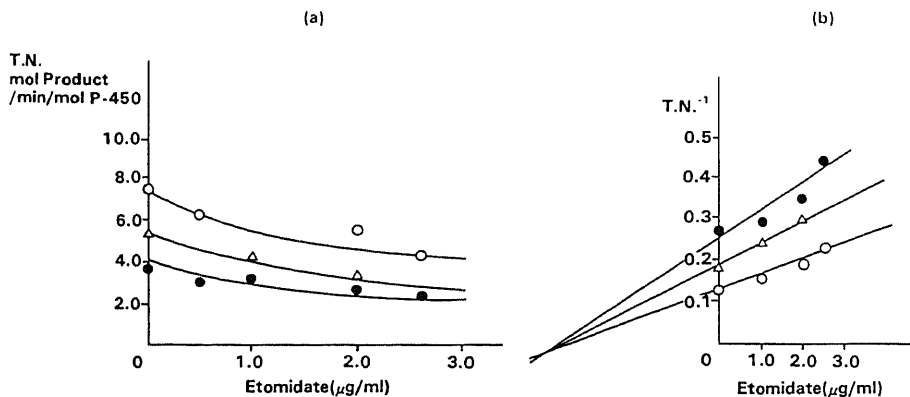


Fig. 12. Inhibitory effect of Etomidate on P-450<sub>scc</sub> II catalyzed 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone to androstenedione reaction.

17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone:  $\circ$ ,  $200 \mu\text{M}$ ;  $\triangle$ ,  $40 \mu\text{M}$ ;  $\bullet$ ,  $20 \mu\text{M}$ .



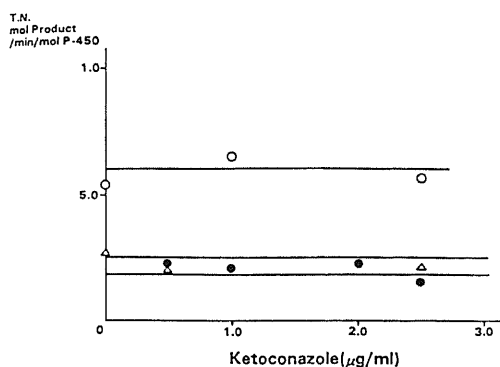


Fig. 13. Inhibitory effect of Ketoconazole on P-450scc II catalyzed 11 $\beta$ -hydroxyprogesterone to 11 $\beta$ , 17 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone reaction. 11 $\beta$ -hydroxyprogesterone concentration:  $\circ$ , 200  $\mu$ M;  $\triangle$ , 100  $\mu$ M;  $\bullet$ , 20  $\mu$ M.

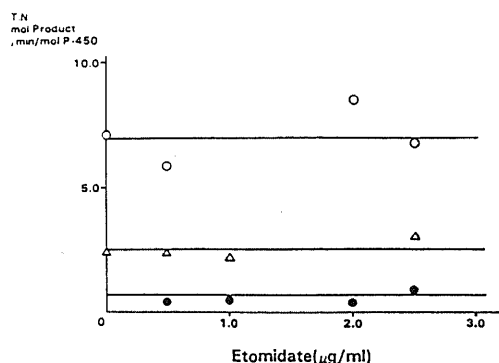


Fig. 14. Inhibitory effect of Etomidate on P-450scc II catalyzed 11 $\beta$ -hydroxyprogesterone to 11 $\beta$ , 17 $\alpha$ -dihydroxyprogesterone. 11 $\beta$ -hydroxyprogesterone concentration:  $\circ$ , 200  $\mu$ M;  $\triangle$ , 100  $\mu$ M;  $\bullet$ , 20  $\mu$ M.

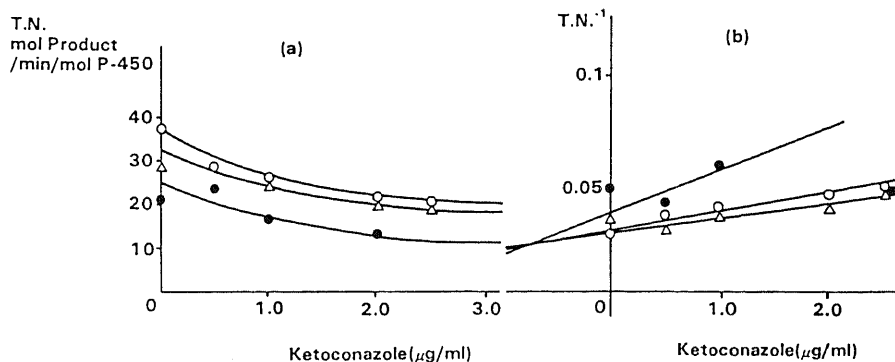


Fig. 15. Inhibitory effect of Ketoconazole on P-450c<sub>21</sub> catalyzed 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone to 11-deoxycortisol. 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone concentration:  $\circ$ , 200  $\mu$ M;  $\triangle$ , 40  $\mu$ M;  $\bullet$ , 8  $\mu$ M.

mol-P450 および 10 mol-product/min/mol-P450 であった。両者の比は約 5 : 1 であり、ウシ副腎皮質ミトコンドリア P-450<sub>11 $\beta$</sub>  は DOC を基質とした場合、約 5 : 1 で 11 $\beta$  位水酸化反応の方が 18 位水酸化反応よりも優位に進行することが確かめられた。ヒトにおいては 11 $\beta$  位対 18 位水酸化反応の比はウシの場合とは異なるとしても、本質的には同様の傾向にあるものと推定される。コルチコステロンから 18 位水酸化コルチコステロンへの変化に対する Ketoconazole の阻害効果について、著者はラット副腎スライスをを用いたインキュベーション実験により、抑制効果は 20 分後に強く認められ、120 分の間継続し、かつその効果が用量依存性であることを報告した<sup>35)</sup>。P-450<sub>11 $\beta$</sub>  は、18 位水酸化反応にも共通の酵素であることから、Ketoconazole がコルチコステロンから 18 位水酸化コルチコステロンへの変換反応にも同様の阻害作用を持つことは、当然予測されることであり、事実、その 50% 阻害濃度は 0.03  $\mu$ g/ml 以下と強力なものであることが確かめられた。また 250  $\mu$ M のコルチコステロンを用いた場合と反応回転数は 2.6 mol-product/min/mol-P450 であるのに対し DOC からコルチコステロンへの回転数は基質濃度 200  $\mu$ M の時、48 mol-product/min/mol-P450 であることから、コルチコステロンから 18 位水酸化コルチコステロンへの反応は DOC からコルチコステロンへの反応に比較して進行しにくく、かつ Ketoconazole によって強く阻害されるものと思われる。

Aminoglutethimide の P-450<sub>11 $\beta$</sub>  に対する拮抗的阻害作用が確認され、阻害定数は 4.8  $\mu$ M と求められた。本剤にはコレステロール側鎖切断反応およびアロマトラーゼに対する阻害作用が従来報告されている<sup>30)~32)</sup>。しかし、本研究により P-450scc に対する作用は認め

られず、P-450<sub>11β</sub> に対する弱い阻害作用を有することが判明した。また o, p'-DDD には 11β-水酸化酵素に対する阻害作用<sup>36)</sup>、Trilostane は 3β-水酸化ステロイド脱水素酵素に対する阻害作用<sup>37)</sup>が報告されている。実験成績からは、両者ともに P-450<sub>11β</sub> の関与する酸化反

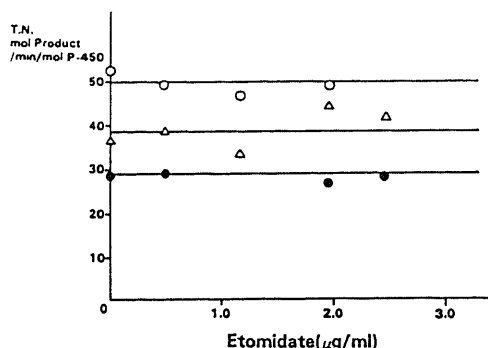


Fig. 16. Inhibitory effect of Etomidate on P-450<sub>c21</sub> catalyzed 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone to 11-deoxycortisol.

17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone concentration: ○, 200  $\mu$ M; Δ, 40  $\mu$ M; ●, 8  $\mu$ M.

応には阻害作用は認められなかった。

Ketoconazole および Etomidate は、P-450<sub>scc II</sub> が触媒する 17-20 側鎖切断反応を阻害しそれぞれの阻害定数は、2.60  $\mu$ M、16.0  $\mu$ M であった。しかし両者ともに同じ P-450<sub>scc II</sub> の触媒する 17  $\alpha$  位水酸化反応には阻害作用を示さなかった。このことは過去の報告と一致する。しかし、Nakajin ら<sup>38)</sup>が報告したごとく P-450<sub>scc II</sub> は 1 つの酵素である。にも拘わらず異なる阻害定数を示した理由として次の様な事を考えている。

基質が P-450 と結合する場所は 1 つと考えられる。プロゲステロン (あるいはプレグネノロン) は P-450<sub>scc II</sub> の特定部位に結合し、まず 17 位が水酸化される。ひきつづき 17-20 側鎖切断反応がおこる。P-450<sub>scc II</sub> との親和性はプロゲステロンと 17  $\alpha$  位水酸化プロゲステロンとは異なるため一部の 17  $\alpha$  位水酸化プロゲステロンは結合部位から遊離してしまう。残存する 17  $\alpha$  位水酸化プロゲステロンもすでに 17 位に水酸基を有し、かつ 17-20 の C-C 結合に対する酸化反応であるため、その環境はプロゲステロンの 17 位水酸化反応とは変化している。これらの条件の違い

Table 1. Effect of inhibitors on the electron-transport system in adrenal mitochondria<sup>#</sup>

	Keto	Eto	o, p' DDD	Tril	Amino	Metyr
0 ( $\mu$ g/ml)	0.215	0.388	0.299	0.265	0.268	0.230
1.0	0.275	0.424	0.222	0.257	0.268	0.275
2.0	0.206	0.388	0.215	0.272	0.229	0.268
3.0	0.162	0.423	0.226	0.272	0.311	0.261
4.0	0.279	0.423	0.233	0.268	0.251	0.275

<sup>#</sup>All figures indicate  $\Delta A/\text{min}$

Various concentrations of inhibitors (up to 4.0  $\mu$ g/ml) were added to assay mixture containing cytochrome c, adrenodoxin reductase, adrenodoxin and potassium phosphate at room temperature. Changes in the UV absorbance at 550 nm ( $\Delta A/\text{min}$ ) were determined.

Keto, Ketoconazole; Eto, Etomidate; Tril, Trilostane; Amino, Aminoglutethimide; Metyr, Metyrapone.

Table 2. Effect of inhibitors on the electron-transport system in adrenal microsomes<sup>#</sup>

	Keto	Eto	o, p' DDD	Tril	Amino	Metyr
0 ( $\mu$ g/ml)	0.183	0.221	0.198	0.183	0.198	0.178
1.0	0.233	0.230	0.219	0.198	0.183	0.161
2.0	0.169	0.240	0.183	0.198	0.183	0.172
3.0	0.183	0.221	0.205	0.212	0.219	0.173

<sup>#</sup>All figures indicate  $\Delta A/\text{min}$ .

Various concentrations of inhibitors (up to 3.0  $\mu$ g/ml) were added to assay mixture containing cytochrome c, FpT, cytochrome b<sub>5</sub> and potassium phosphate at room temperature. Changes in the UV absorbance at 550nm ( $\Delta A/\text{min}$ ) were determined.

Keto, Ketoconazole; Eto, Etomidate; Tril, Trilostane; Amino, Aminoglutethimide; Metyr, Metyrapone.

が同じ P-450scc II が担当する酸化反応でありながら阻害定数の違いとなって表われたと思われる。

同様な事実は P-450 が関与する他のステロイド代謝においても見うけられる。例えば DOC からアルドステロンへの代謝は P-450<sub>11β</sub> が担当しているが DOC は P-450<sub>11β</sub> に結合すると 11 位, 18 位, 19 位が酸化反応の標的になる。これらの酸化は一定の比率で 11>18>19 位の順に進行する。酸化反応が進むにつれ反応生成物と P-450<sub>11β</sub> との親和性は変化し、少しずつ遊離また一部は再結合する。このようにして P-450<sub>11β</sub> を介して次々に生理活性を有する DOC, コルチコステロン, 18 位水酸化コルチコステロン, アルドステロンが産生される。またコレステロールからプレグネロンへの反応は、P-450scc 上で行われるが途中いくつかの中間生成物が考えられる。しかしコレステロールの殆どはプレグネロンまで酸化反応を受けてしまう。P-450scc 上ではコレステロールの側鎖は酵素とは一定の距離を有しており大きな障害なしに酸化反応は次々と進行する。中間生成物と P-450scc との親和性が強い変動を受けないこともこの反応を最後まで進行させることに関与していると思われる。

副腎皮質ではコレステロールから様々な生理活性を有する物質が産生されている。しかし、存在する酵素は、P-450scc, P-450<sub>11β</sub>, P-450c<sub>21</sub>, P-450scc II, P-450aromatase 及び 3β 水酸化ステロイド脱水素酵素の 6 種類である。上記の様な環境が作りだされる事により少ない酵素で多くの生理活性物質の産生を可能に

しているものと思われる。

P-450c<sub>21</sub> との親和性との違いからプロゲステロンではなく 17α 位水酸化プロゲステロンを採用した。したがってその反応生成物は 11-デオキシコルチゾールである。Ketoconazole のみが阻害定数 1.26 μM で阻害作用を示した。その他の薬剤はいずれも 0~2.5 μg/ml の濃度範囲に渡って阻害作用を認めなかった。Etomidate に阻害が認められなかったのは、その阻害定数が大きいためとも考えられる。

チトクローム P-450 が触媒する水酸化反応は、その電子伝達系はミクロゾーム型とミトコンドリア型に分けられる。ミクロゾーム型では、NADPH または NADH を電子供与体として、P-450 還元酵素 (FpT, チトクローム b5) と、P-450 の二成分から構成される。一方ミトコンドリア型では、NADPH を電子供与体としてアドレノドキシン還元酵素, アドレノドキシン, P-450 の三成分からなる。本研究では、P-450 の吸収スペクトルの変化を直接みるのではなく、チトクローム C を使用してその 550 nm の吸収度の変化率を測定することで、各薬剤の作用を検討した。このため P-450 還元酵素系に対する効果を見たことになり、チトクローム P-450 への最終的電子の授受への作用は不明である。成績は表 1, 表 2 の如く各種薬剤ともに直接的影響は観察されなかった。

全体の成績を表 3 にまとめた。本研究により副腎皮質ステロイド合成阻害作用が話題になっている Ketoconazole, Etomidate 及び合成阻害作用が知られ、臨

Table 3. Effect of inhibitors of steroidogenesis on cytochrome P-450 catalyzed reactions#

	Keto	Eto	o,p'DDD	Tril	Amino	Mettyr
P-450scc	0.98	0.21	(-) ※	(-)	(-)	160
P-450 <sub>11β</sub>	0.56	0.74	(-)	(-)	4.83	0.10
P-450c <sub>21</sub>	1.26	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
P-450scc II						
(17α-hyd)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
(17, 20ly)	2.60	16.0	(-)	(-)	(-)	(-)
E. T. S. of mito.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
E. T. S. of micro.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

#All figures indicate Ki value(μM). ※(-) no inhibition.

Keto, Ketoconazole; Eto, Etomidate; Tril, Trilostane; Amino, Aminoglutethimide; Mettyr, Metirapone; E. T. S. of mito, electron-transport system in adrenal mitochondria; E. T. S. of micro, electron-transport system in adrenal microsomes; 17α-hyd, P-450scc II catalyzed 17α-hydroxylation of C<sub>21</sub> steroids; 17, 20ly, P-450scc II catalyzed 17, 20 cleavage reaction of 17α-hydroxy C<sub>21</sub> steroids.

床応用されている数種の薬剤について、その阻害様式、阻害部位及び相対的阻害強度が始めて明らかになった。

## 結 論

精製副腎皮質チトクローム P-450 及び電子伝達系酵素からなる副腎ステロイド酸化反応再構成系を用いて、Ketoconazole, Etomidate などのイミダゾール化合物及びステロイド合成阻害作用の知られた数種の薬剤につき、作用効果の検討を行い次の結論を得た。

1. Ketoconazole は精製ミトコンドリア P-450<sub>scc</sub>, P-450<sub>11β</sub> 及びミクロゾーム P-450<sub>c21</sub>, P-450<sub>scc</sub> II 再構成系による副腎皮質ステロイド水酸化反応に対して、拮抗的阻害作用を有し、その阻害定数はそれぞれ 0.98 μM, 0.56 μM, 1.26 μM, 2.60 μM であった。副腎皮質ステロイド代謝の広範な部位に阻害作用を及ぼしかつその効果は強力であることが判明した。

2. Etomidate は精製ミトコンドリア P-450<sub>scc</sub>, P-450<sub>11β</sub> 及びミクロゾーム P-450<sub>scc</sub> II 再構成系による副腎皮質ステロイド水酸化反応に対して拮抗的阻害作用を有し、その阻害定数はそれぞれ 0.21 μM, 0.74 μM, 16.0 μM であった。Ketoconazole と比較して、ミクロゾーム系ではその作用は弱い、ミトコンドリア系には遜色のない阻害効果を認めた。

3. Aminogluthetimide は、P-450<sub>11β</sub> 再構成系 DOC 水酸化反応に対して、阻害定数 4.83 μM と弱い阻害効果を認めた。その他の反応系には作用は認めなかった。Metyrapone はミクロゾーム系 P-450 水酸化反応に対しては、影響を及ぼさなかった。Trilostane, o, p'-DDD については、副腎皮質 P-450 の担当するいずれのステロイド代謝にも阻害作用は認められなかった。

4. 副腎皮質ミトコンドリア及びミクロゾーム内電子伝達系に対しては、上記のすべての薬剤について直接的影響は観察されなかった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御稿閲賜りました恩師竹田亮祐教授に深謝致します。また、始終御指導、御助言頂きました宮森勇講師および高血圧グループの諸先生方に感謝致します。本研究を当初より御指導、御教示頂きました金沢大学理学部化学科片桐正之教授、板垣英治助教授、須原克子博士、ならびに教員員の皆様にごころから感謝致します。

なお、本論文の要旨は、第4回日本臨床薬理学会（1983年 京都）日本内分泌学会 第57回総会（1984年 東京）第57回秋期大会（1984年 神戸）第58回総会（1985年 名古屋）第59回総会（1986年 仙台）第17回 Intern. Symposium of the J. steroid Biochemistry.（1985年 チロル）および第68回 Ann. Meeting, The Endocrine

Society.（1986年 アンハイム）で発表した。

## 文 献

- 1) Bossche, V. D., Willemsens, H. G., Cools, W., Cornelissen, F., Lauwers, W. F. & Van. Cutsem, J. M.: In vitro and in vivo effects of the antimycotic drug ketoconazole on steroid synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **17**, 922-928 (1980).
- 2) Pont, A., Williams, P. L., Loose, D. S., Feldman, D., Reitz, R. E., Bochar, C. & Stevens, D. A.: Ketoconazole blocks adrenal steroidogenesis. *Ann. Med.*, **97**, 370-372 (1982).
- 3) Engelhardt, D., Mann, K., Horman, R., Brann, S. & Karl, H. J.: Ketoconazole inhibits cortisol secretion of adrenal adenoma in vivo and in vitro. *Klin. Wschr.*, **61**, 373-375 (1983).
- 4) Contreras, P., Altier, E., Liverman, C., Gac, A., Rojas, A., Ibarra, A., Rovanal, M. & Seron-Ferre, M.: Adrenal rest tumor of the liver causing cushing's syndrom; treatment with Ketoconazole preceding an apparent surgical cure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **60**, 21-28 (1985).
- 5) Trachtenberg, J.: Ketoconazole therapy in advanced prostatic cancer. *J. Urol.*, **132**, 61-63 (1984).
- 6) Ledingham, I. McA. & Watt, I.: Influence of sedation on mortality in critically ill multiple trauma patients. *Lancet* **I**, 1270 (1983).
- 7) Fellows, W., Byrne, A. J. & Allison, S. P.: Adrenocortical suppression with etomidate. *Lancet* **II**, 54-55 (1983).
- 8) Allolio, B., Stuttmann, R., Fischer, H., Leonhard, U. & Winkelmann, W.: Long-term etomidate and adrenocortical suppression. *Lancet* **II**, 626 (1983).
- 9) Bossche, H. V., Willemsens, G., Colls, W. & Bellens, D.: Effects of etomidate on steroid biosynthesis in subcellular fractions of bovine adrenals. *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 3861-3868 (1984).
- 10) Lambert, A., Frost, J., Mitchell, R., Wilson, A. U. & Robertson, W. R.: On the site of action of the antiadrenal steroidogenic effect of etomidate and megestrol acetate. *Clin. Endocrinol.*, **21**, 721-727 (1984).
- 11) Kenyon, C. J., Young, J., Gray, C. E. & Fraser, R.: Inhibition by etomidate of steroidogenesis in isolated bovine adrenal cells. *J. Clin.*

Endocrinol. Metab., 58, 947-949 (1984).

- 12) Loose, D. S., Kan, P. B., Hirst, M. A., Marcus, R. A. & Feldman, D.: Ketoconazole inhibits adrenal steroidogenesis by inhibiting cytochrome P-450-dependent enzymes. *J. Clin. Invest.*, 71, 1485-1499 (1983).
- 13) 永井国雄, 宮森 勇, 竹田亮祐, 板垣英治, 片桐正之: 精製チトクローム P-450<sub>11 $\beta$</sub>  触媒反応に及ぼす副腎ステロイド生成阻害剤の作用—ketoconazole を中心に—. *日内分泌会誌*, 61, 90-96 (1985).
- 14) Nagai, K., Miyamori, K., Ikeda, M., Koshida, H., Takeda, R., Suhara, K. & Katagiri, M.: Effect of Ketoconazole (an imidazole antimycotic agent) and other inhibitors of steroidogenesis on cytochrome P-450-catalyzed reactions. *J. steroid Biochem.*, 24, 321-323 (1986).
- 15) Suhara, K., Gomi, T., Sato, H., Itagaki, E., Takemori, S. & Katagiri, M.: Purification and immunological characterization of the two adrenal cortex mitochondrial cytochrome P-450 proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 190, 290-299 (1978).
- 16) Suhara, K., Fujimura, Y., Schiroo, M. & Katagiri, M.: Multiple catalytic properties of the purified and reconstituted cytochrome P-450 (P-450<sub>sc II</sub>) system of pig testis microsomes. *J. Biol. Chem.*, 259, 8729-8739 (1994).
- 17) Pont, A., Goldman, E. S., Sugar, A. M., Siiteri, P. K. & Stevens, D. A.: Ketoconazole-induced increase in estradiol-testosterone ratio. Probable explanation for gynecomastia. *Arch. Intern. Med.*, 145, 1429-1431 (1985).
- 18) Schürmeyer, T. & Nieschlag, E.: Ketoconazole induced drop in serum and saliva testosterone. *Lancet* II, 1092 (1982).
- 19) Schürmeyer, T. & Nieschlag, E.: Effect of ketoconazole and other imidazole fungicides on testosterone biosynthesis. *Acta. Endocrinol.*, 105, 275-280 (1984).
- 20) Santen, R. J., Bossche, H. V., Symoens, J., Brugmas, J. & De Coster, R.: Site of action of low dose ketoconazole on androgen biosynthesis in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 57, 732-736 (1983).
- 21) De Coster, R., Beeres, D., Dom, J. & Willemsens, G.: Endocrinological effect of single daily ketoconazole administration in male beagle dog. *Acta. Endocrinol.* 107, 275-281 (1984).
- 22) Engelhardt, D., Dörr, G., Jaspers, C. &

Dörr, D.: Ketoconazole blocks cortisol secretion in man by inhibition of adrenal 11 $\beta$ -hydroxylase. *Klin. Wschr.*, 63, 607-612 (1985).

- 23) Dörr, H. G., Kuhnle, U., Holthausen, H., Bidlingmaier, F. & Knorr, D.: Etomidate; A selective adrenocortical 11 $\beta$ -hydroxylase inhibitor. *Klin. Wochenschr.*, 62, 1011-1031 (1984).
- 24) Wagner, R. L., White, P. H., Kan, P. B., Rosenthal, M. H. & Feldman, D.: Inhibition of adrenal steroidogenesis by the anesthetic etomidate. *N. Engl. J. Med.*, 310, 1415-1421 (1984).
- 25) De Jong, F. H., Mallios, C., Jansen, C., Scheck, P. A. E. & Lamberts S. W. J.: Etomidate suppresses adrenocortical function by inhibition of 11 $\beta$ -hydroxylation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 59, 1143-1147 (1984).
- 26) Fry, D. E. & Griffiths, H.: The inhibition by etomidate of the 11 $\beta$ -hydroxylation of cortisol. *Clin. Endocrinol.*, 20, 625-129 (1984).
- 27) Fraser, R., Watt, I., Gray, C. E., Ledingham, I. M. & Lever, A. F.: The effect of etomidate on adrenocortical function before and during hemorrhage shock. *Endocrinology*, 115, 2266-2270 (1984).
- 28) De Coster, R., Beerens, D., Haeterman, C. & Wouters, L.: Effect of etomidate on cortisol biosynthesis in isolated guinea-pig adrenal cells; comparison with metyrapone. *J. Endocrinol. Invest.* 8, 199-202 (1985).
- 29) Allolio, B., Dörr, H., Stuttmann, R., Knorr, D., Engelhardt, D. & Winkelmann, W.: Effect of a single bolus of etomidate upon major corticosteroid hormones and plasma ACTH. *Clin. Endocrinol.* 22, 281-286 (1985).
- 30) Touitou, Y., Legrand, J. C. & Desgey, P.: Adrenocortical steroidogenesis and aminoglutethimide. *Biomedicine*, 18, 185-191 (1973).
- 31) Ralph, C., Brough, A. J., Cohen, M. N. P. & Satoh, P. S.: Aminoglutethimide (Elipten-Ciba) as an inhibitor of adrenal steroidogenesis; mechanism of action and therapeutic trial. *J. Clin. Endo.*, 27, 1239 (1967).
- 32) Asbury R. F., Bakemeier, R. F., Felsch, E., McCure, C. S., Savlov, E. & Bennett, J. M.: Treatment of metastatic breast cancer with aminoglutethimide. *Cancer*, 47, 1954-1958 (1981).
- 33) Hart, M. M. & Straw, J. A.: Studies on the

site of action o, p'DDD in the dog adrenal cortex. ; Inhibition of ACTH-mediated pregnenolone synthesis. *Steroid*, 559-574 (1971).

34) Sato, H., Ashida, N., Suhara, K., Itagaki, E., Takemori, S. & Katagiri, M.: Properties of an adrenal cytochrome P-450 (P-450<sub>11 $\beta$</sub> ) for the hydroxylations of corticosteroids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**, 307-314 (1978).

35) 永井国雄, 宮森 勇, 池田正寿, 武田仁勇, 安原修一郎, 越田英夫, 森瀬敏夫, 滝本弘明, 竹田亮祐, Vecsei, V.: 副腎ステロイド産生に及ぼす Ketoconazole の影響, *臨床薬理*, **15**, 197-198 (1984).

36) Brown, R. D., Nicholson, W. E., Chick, W. T. & Strott, C. A.: Effect of o, p'DDD on human steroid 11 $\beta$ -hydroxylation activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **36**, 730-733 (1973).

37) 小島元子, 笹野伸昭: 新しいステロイド合成阻害剤 Trilostane の in vitro における酵素阻害剤について. *日内分泌会誌*, **57**, 997-1008 (1981).

38) Nakajin, S. & Hall, P. F.: Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis. *J. Biol. Chem.* **256**, 3871-3876 (1981).

Effect of Inhibitors of Steroidogenesis on Cytochrome P-450 Catalyzed Reactions  
Kunio Nagai, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., **95**, 915—929 (1986)

**Key words** : Steroidogenesis, Cytochrome P-450, Ketoconazole, Etomidate.

### Abstract

The present study was intended to examine the effect of Ketoconazole, Etomidate and some other known inhibitors of steroidogenesis on the purified reconstituted steroid monooxygenase system. The system consisted of cytochrome P-450 and its electron-transporting components such as adrenodoxin, its reductase, cytochrome b<sub>5</sub>, NADPH-cytochrome b<sub>5</sub> reductase (FpD) and NADPH-cytochrome P-450 reductase (FpT) which had been purified from bovine adrenal mitochondria and pig testis microsomes. Ketoconazole and Etomidate competitively inhibited side chain cleavage reaction of cholesterol to form pregnenolone. The K<sub>i</sub> values for Ketoconazole and Etomidate were 0.98  $\mu$ M and 0.21  $\mu$ M respectively. Compared with Metyrapone, (K<sub>i</sub>=160  $\mu$ M), Ketoconazole and Etomidate were potent inhibitors of cholesterol side chain cleavage enzyme (P-450<sub>scc</sub>) catalyzed reactions. Aminoglutethimide, Mitotane (o, p'-DDD) and Trilostane over the wide concentration range, failed to inhibit this reaction. Ketoconazole competitively inhibited hydroxylation of deoxycorticosterone (DOC) at the 11 $\beta$ -position to form corticosterone and at the 18-position to form 18-hydroxy DOC. The K<sub>i</sub> value for Ketoconazole, calculated from either the 11 $\beta$ -hydroxylase reaction or the 18-hydroxylase reaction, was 0.56  $\mu$ M. Ketoconazole also inhibited 18-hydroxylation of corticosterone to form 18-hydroxycorticosterone, with 50% inhibitory concentration of less than 0.03  $\mu$ g/ml. The corresponding value in case of 18-hydroxylation of DOC was 0.3  $\mu$ g/ml. The conversion of corticosterone to 18-hydroxycorticosterone was inhibited more potently than that of DOC to 18-hydroxy DOC by Ketoconazole. Etomidate, Aminoglutethimide and Metyrapone also had an inhibitory effect on P-450<sub>11 $\beta$</sub>  catalyzed reactions with K<sub>i</sub> values of 0.74  $\mu$ M, 4.83  $\mu$ M and 0.10  $\mu$ M respectively. Ketoconazole and Etomidate competitively inhibited cleavage of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone at the 17, 20 bond to give androstenedione with the K<sub>i</sub> values of 2.60  $\mu$ M and 16.0  $\mu$ M, respectively. All other drugs of adrenal steroid inhibitory action failed to inhibit the same 17, 20 lyase (P-450<sub>scc</sub> II) system. All of the above listed inhibitors, over a wide variety of concentration ranges, had no significant effect on the 17 $\alpha$ -hydroxylation of 11 $\beta$ -hydroxyprogesterone, the conversion also catalyzed by the same P-450<sub>scc</sub>II. Ketoconazole inhibited P-450<sub>c<sub>21</sub></sub> catalyzed 17 $\alpha$ -hydroxy-

pregesterone to 11-deoxycortisol with a  $K_i$  value of  $1.26 \mu\text{M}$ . Other drugs including Etomidate failed to inhibit the same P-450<sub>c<sub>21</sub></sub> system. The electron-transporting system was not affected by either of these drugs. In conclusion, the present study demonstrates the precise site of action and relative potency of some known inhibitors of steroidogenesis, with particular reference to Ketoconazole and Etomidate, using a reconstituted steroid monooxygenase system.